硒增强二十二碳六烯酸在脂多糖诱导巨噬细胞炎性反应中的抗炎作用

徐绮嫔 黄逸馨 罗正中 沈留红 姚学萍 余树民 曹随忠*

（四川农业大学动物医学院，成都 611130）

摘 要：**为了**探究硒是否影响二十二碳六烯酸（DHA）在脂多糖（LPS）诱导巨噬细胞炎性反应中发挥的抗炎作用。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞分别经 10 μg/mL DHA、10 μg/mL DHA+0.05 μmol/L 亚硒酸钠、1 μg/mL LPS、10 μg/mL DHA+1 μg/mL LPS、10 μg/mL DHA+1 μg/mL LPS+0.05 μmol/L 亚硒酸钠诱导 24 h，同时设置无添加的正常组。采用半定量反转录 PCR 检测细胞肿瘤坏死因子 α（*TNF-α*）、白细胞介素 1β（*IL-1β*）、白细胞介素 6（*IL*-6）和白细胞介素 10（*IL*-10）mRNA 表达量，酶联免疫吸附测定法（ELISA）测定培养液上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 含量。结果显示，添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）不仅显著或极显著增强了 DHA（10 μg/mL）对 LPS（1 μg/mL）诱导 RAW264.7 细胞中促炎细胞因子 *TNF-α* mRNA 表达($P<0.05$)和 IL-1β 生成($P<0.01$)的抑制作用，还极显著增强了 DHA 促进抗炎细胞因子 *IL*-10 mRNA 表达的作用($P<0.01$)。**由此提示，**硒可增强 DHA 在 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抗炎作用。

关键词：二十二碳六烯酸；硒；巨噬细胞；抗炎作用

中图分类号：S852.2

过度或持续性炎症反应会引发许多疾病，如何有效地控制以及治疗炎症性疾病仍然是人们关注的研究热点。肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α,*TNF-α*)、白细胞介素 1β(interleukin 1 β,*IL-1β*)等细胞因子的过表达可导致过度炎症反应[1]，抑制这些促炎性介质释放可能有利于减弱炎症反应而改善疾病预后。研究发现，食物中的二十碳五烯酸（eicosapentaenoic acid,EPA）和二十二碳六烯酸（docosahexaenoic acid,DHA）等长链 n-3 多不饱和脂肪酸（n-3 polyunsaturated fatty acids,n-3 PUFAs）影响脂蛋白代谢、内皮细胞功能、血管反应性以及炎性标记物和细胞因子的生成，有助于治疗人类心血管疾病等炎症性疾病[2]。硒（selenium,Se）是动物机体的一种必需微量元素，其以硒代半胱氨酸的形式掺入硒蛋白中，几乎参与调控所有组织和细胞的氧化应激、还原作用以及其他重要细胞过程，发挥抗炎效应[3-4]。饮食摄入足量硒能够改善乳房炎、心血管病及骨质疏松症等各种炎症性疾病[5-7]。目前，DHA 和硒各

收稿日期：2017-03-29

基金项目：四川农业大学学科建设双支计划（3572070）；四川省教育厅重点项目（15ZA0024）

作者简介：徐绮嫔（1993-），女，广西玉林人，硕士研究生，临床兽医学专业。E-mail: qipinxu@126.com

*通信作者：曹随忠，教授，E-mail: suizhongcao@ 126.com

自抗炎作用及其机制的研究已取得显著进展，却仍缺乏 n-3 PUFAs 和硒相互作用的研究。

巨噬细胞在炎症启动、发展和消退中均发挥重要作用[8]，经脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导活化的巨噬细胞会产生大量 IL-1β、TNF-α 和白细胞介素 6（IL-6）等促炎细胞因子[8-9]。研究表明，在降低 LPS 诱导巨噬细胞表达促炎细胞因子 *IL-1β* 和 *IL-6* 上，DHA 具有比二十碳五烯酸（EPA）更强的作用[10-12]。因此，本研究基于常用巨噬细胞系——RAW264.7 小鼠巨噬细胞，通过监测促炎和抗炎细胞因子 mRNA 表达情况及其蛋白质含量，探究硒是否影响 DHA 在 LPS 诱导巨噬细胞炎性反应中发挥的抗炎作用，以期为通过“饮食干预”调节不受控炎症反应的替代策略提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系

小鼠（*Mus musculus*）巨噬细胞系 RAW264.7 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养液购自 Gibico 公司；二甲基亚枫(DMSO)、LPS（L2880）和亚硒酸钠（Na_2SeO_3，S5261）均购自 Sigma 公司；DHA（S49140，纯度≥98%）购自上海源叶生物科技有限公司；胎牛血清（FBS）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；*L*-谷氨酰胺购自 Biosharp 公司；EASYspin plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒（RN2802）购自艾德莱生物科技有限公司；Fast Quant cDNA 第 1 链合成试剂盒（KR106）和 DNA Marker Ⅰ购自天根生化科技（北京）有限公司；Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)购自宝生物工程（大连）有限公司；小鼠 TNF-α、IL1-β、IL-6 和白细胞介素 10（IL-10）生物素双抗体夹心 ELISA 试剂盒购自北京雅安达生物技术有限公司。

1.3 主要仪器设备

二氧化碳培养箱和酶标仪(Thermo 公司)；超净工作台；PCR 仪和凝胶成像仪（Bio-Rad 公司）；DYY－Ⅲ电泳仪（北京六一仪器厂）；等。

1.4 试验方法

1.4.1 细胞培养与分组

将小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 接种至培养皿（直径 10 cm）中，采用 DMEM 高糖培养液（含 10% FBS），5% CO_2 37 ℃条件下培养至 80%融合。试验分组见表 1，每组设 3 个重复，将细胞按 4.5×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板，每孔加 2 mL DMEM 高糖培养液（含 10% FBS），在 5% CO_2 37 ℃条件下培养 24 h。更换新鲜培养液，并按分组添加 LPS（100 μg/mL）、DHA（10 mg/mL）和亚硒酸钠(100 μmol/mL)使得 LPS、DHA 和亚硒酸钠终浓度分别为 1

μg/mL、10 μg/mL 和 0.05 μmol/L，继续培养 24 h，分别收集细胞和培养上清液，细胞用于提取总 RNA，上清液-20 ℃保存。

表 1　试验分组

Table 1　Experimental grouping

组别 Groups	脂多糖 LPS（1 μg/mL）	二十二碳六烯酸 DHA（10 μg/mL）	亚硒酸钠 Na_2SeO_3（0.05 μmol/L）
正常 Normal	-	-	-
D	-	+	-
DS	-	+	+
L	+	-	-
LD	+	+	-
LDS	+	+	+

1.4.2　半定量反转录 PCR 检测 *TNF-α*、*IL*-1*β*、*IL*-6 和 *IL*-10 mRNA 表达

按 EASYspin plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒操作说明提取各组细胞总 RNA。按 FastQuant cDNA 第 1 链合成试剂盒操作说明反转录合成 cDNA 第 1 链，-20 ℃保存。以 cDNA 第 1 链为模板，用各引物（由华大基因合成，信息如表 2 所示），分别进行 PCR 扩增，反应体系为：cDNA 1 μL，上、下游引物各 1 μL，Premix Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 9.5 μL，ddH_2O 7.5 μL，共 20 μL。反应条件为：94 ℃变性 30 s，相应退火温度退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳（100 V，30 min）并用 Bio-Rad 凝胶成像仪采集图像，利用 Image J 软件对电泳图进行分析，计算出各区带灰度值，以 β 肌动蛋白（β-actin）为内参基因。

目的基因 mRNA 表达量=（目的基因条带灰度值/内参基因条带灰度值）×100。

表 2　引物信息

Table 2　Primer information

基因（GenBank 登录号） Genes （GenBank accession number）	序列 Sequences（5′-3′）	退火温度 Tm/℃	产物大小 Product size/bp
β 肌动蛋白 β-actin（NM_007393.5）	F:ACTCCTATGTGGGTGACGAG R:CACGGTTGGCCTTAGGGTT	59	198
肿瘤坏死因子 α *TNF-α*（NM_013693.3）	F：CAGGGGCCACCACGCTCTTC R：CTTGGGGCAGGGGCTCTTGAC	57	419

白细胞介素 1β *IL*-1*β*（NM_008361.4）	F:GCTTCAGGCAGGCAGTAT R:ACAAACCGCTTTTCCATCT	52	475
白细胞介素 6 *IL*-6（NM_031168.2）	F:GAAATCGTGGAAATGAG R:TAGGTTTGCCGAGTAGA	50	455
白细胞介素 10 *IL*-10（NM_010548.2）	F:ACCTGGTAGAAGTGATGCC R:CAAGGAGTTGTTTCCGTTA	58.9	367

1.4.3 ELISA 法测定 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 含量

按小鼠 TNF-α、IL1-β、IL-6 和 IL-10 生物素双抗体夹心 ELISA 试剂盒操作说明测定细胞培养上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 含量。各浓度标准品和样品均设 3 个重复，以空白孔调零，应用酶标仪以 450 nm 波长依序测量各孔吸光度（OD）值，分别绘制标准曲线，计算样品中细胞因子含量。

1.5 统计学分析

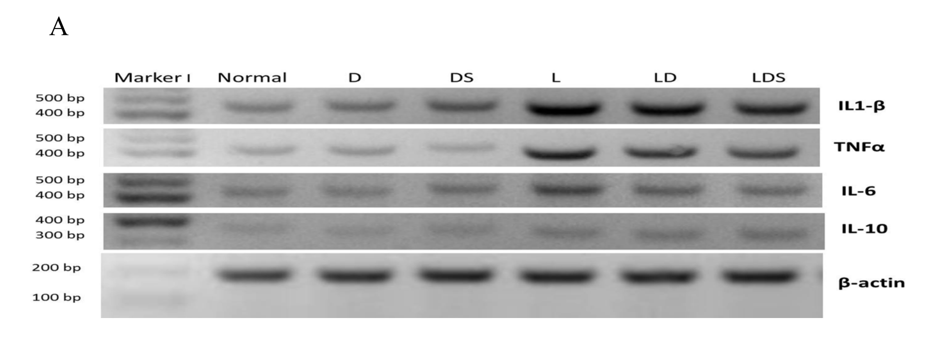
所有数据均统计为“平均值±标准差”，并应用 SPSS 20.0 软件进行统计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）程序分析数据，以 P＜0.05 为差异显著。

2 结果与分析

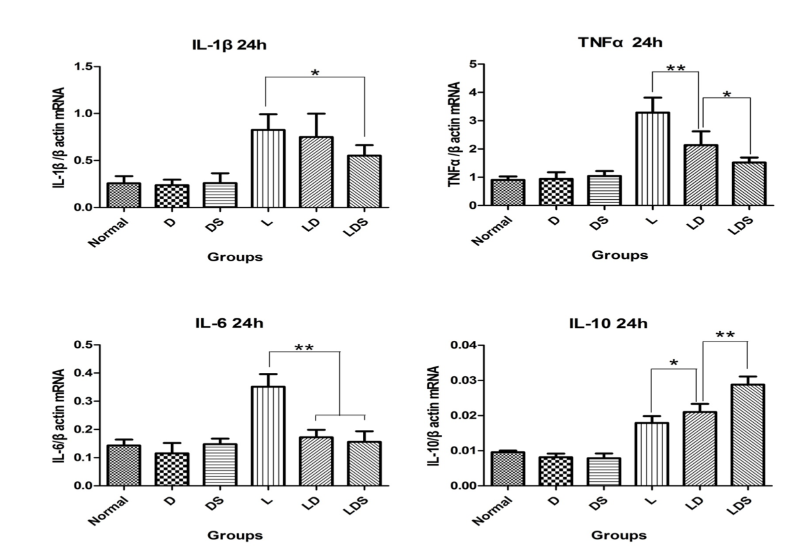
2.1 DHA 和 Se 对 LPS 诱导细胞 *TNF-α*、*IL*-1*β*、*IL*-6 和 *IL*-10 mRNA 表达量的影响

半定量反转录 PCR 结果（图 1）显示，添加 DHA（10 μg/mL）或 DHA（10 μg/mL）和亚硒酸钠（0.05 μmol/L）对未经 LPS 诱导的细胞 *TNF-α*、*IL*-1*β*、*IL*-6 和 *IL*-10 mRNA 表达量无显著影响（P＞0.05）。添加 DHA（10 μg/mL）极显著地降低了 LPS（1 μg/mL）诱导的细胞 *TNF*-α 和 *IL*-6 mRNA 表达量（P＜0.01），显著地增加了 *IL*-10 mRNA 的表达量（P＜0.05），*IL*-1*β* mRNA 表达量有所降低，但差异不显著（P＞0.05）。添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）显著地增强了 DHA（10 μg/mL）对 LPS（1 μg/mL）诱导的细胞 *TNF-α* mRNA 表达的抑制作用（P＜0.05），且极显著地增强了 DHA 上调 LPS（1 μg/mL）诱导的细胞 *IL*-10 mRNA 表达的作用（P＜0.01），*IL*-6 和 *IL*-1*β* mRNA 表达量有所降低，但差异不显著（P＞0.05）。添加 DHA（10 μg/mL）和亚硒酸钠（0.05 μmol/L）显著下调经 LPS 诱导的细胞 *IL*-1*β* mRNA 表达（P＜0.05）。

A



B



n=3，*表示差异显著（*P*＜0.05），**表示差异极显著（*P*＜0.01）。下图同。

n=3，* indicated significant difference（*P*＜0.05），** indicated extremely significant difference（*P*＜0.01）. The same below.

A.*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*IL-10* 和 β 肌动蛋白 PCR 产物的 2%琼脂糖凝胶电泳图（100 V，30 min）；B.*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*IL-10* mRNA 表达量。

A. agarose gel （2%） electrophoresis images of PCR products of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10* and β-actin （100 V，30 min）; B. expression levels of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* and *IL-10* mRNAs.

图 1　半定量反转录 PCR 检测结果

Fig.1　The results of semi-quantitative reverse transcription PCR

2.2　DHA 和 Se 对 LPS 诱导细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 生成的影响

ELISA 测定结果(图 2)显示，添加 DHA（10 μg/mL）或 DHA（10 μg/mL）和亚硒酸钠（0.05 μmol/L）对未经 LPS 诱导的细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 含量无显著影响（*P*＞0.05）。添加 DHA（10 μg/mL）显著或极显著地降低了 LPS（1 μg/mL）诱导的细胞促炎性细胞因子 IL-1β（*P*＜0.05）、TNF-α（*P*＜0.01）和 IL-6 含量（*P*＜0.01），同时显著地增加了抗炎细胞因子 IL-10 含量（*P*＜0.05）。添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）极显著地增强了 DHA（10 μg/mL）下调 LPS（1 μg/mL）诱导细胞生成 IL-1β 的作用（*P*＜0.01），而 TNF-α 和 IL-6

含量有所降低，但差异不显著（$P>0.05$），抗炎细胞因子 IL-10 含量有所升高，但差异不显著（$P>0.05$）。添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）和 DHA（10 μg/mL）极显著地增加了 LPS（1 μg/mL）诱导细胞的 IL-10 含量（$P<0.01$）。

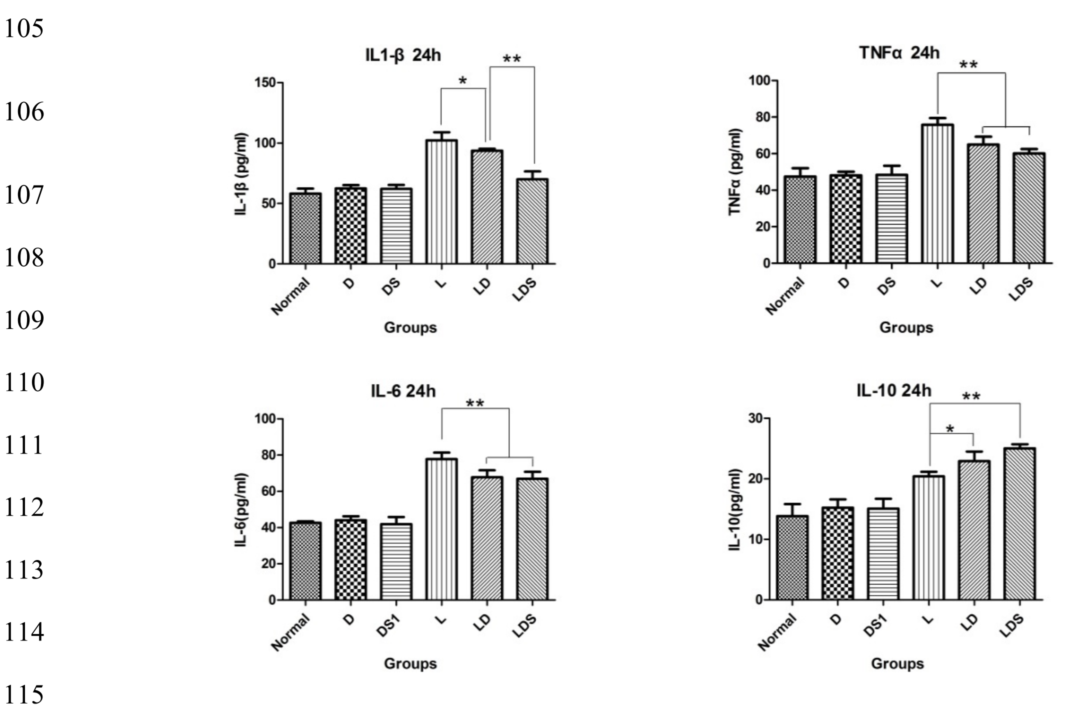


图 2　DHA 和 Se 对 LPS 诱导细胞培养液上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 含量的影响

Fig.2　Effects of DHA and Se on contents of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 in supernatant of culture medium of cells induced by LPS

3　讨 论

细胞因子的生成对于控制入侵病原体的生长传播具有重要意义，过量的细胞因子则对机体不利，例如持续性过量产生 TNF-α 和 IL-1β 引起肌肉萎缩和骨量丢失[9]，调控炎性介质释放有利于改善疾病预后。研究已表明，添加 EPA 和 DHA 孵育细胞，能抑制 RAW264.7 细胞生成 IL-6 和 TNF-α[13]，能抑制 LPS 诱导 THP-1 细胞 *TNF-α*和 *IL-1β* mRNA 表达[14]。硒通过硒蛋白发挥免疫调节作用，添加硒能抑制丝裂原活化蛋白激酶途径而显著降低 LPS 诱导巨噬细胞环氧化酶 2(*COX*-2)和 *TNF-α* 基因表达量[15]，硒蛋白缺失巨噬细胞中 *TNF-α* 基因表达量显著增加[16]。本研究结果显示，添加 DHA(10 μg/mL)能极显著抑制 LPS（1 μg/mL）诱导 24 h 时 RAW264.7 细胞 *TNF*-α 和 *IL*-6 mRNA 表达，显著地促进 *IL*-10 mRNA 表达，但对 *IL*-1*β* mRNA 表达的下调作用不显著；添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）能显著增强 DHA（10 μg/mL）对 LPS（1 μg/mL）诱导 24 h 时巨噬细胞 *TNF-α* mRNA 表达的抑制作用，以及对 *IL*-10 mRNA 表达的促进作用。此外，DHA（10 μg/mL）与亚硒酸钠（0.05 μmol/L）联合显著下

调了 LPS（1 μg/mL）诱导的巨噬细胞 *IL*-1*β* mRNA 表达，但亚硒酸钠（0.05 μmol/L）在 DHA（10 μg/mL）下调 *IL*-6 mRNA 表达的作用中影响不显著。此外，蛋白质水平检测结果显示，DHA（10 μg/mL）显著或极显著降低了 LPS（1 μg/mL）诱导 24 h 时巨噬细胞 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的含量，同时显著地增加了巨噬细胞 IL-10 的含量；添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）增强了 DHA（10 μg/mL）对 LPS（1 μg/mL）诱导 24 h 时巨噬细胞 IL-1β 含量的下调作用和 IL-10 含量的上调作用。

可见，添加亚硒酸钠（0.05 μmol/L）不仅显著增强了 DHA（10 μg/mL）对 LPS（1 μg/mL）诱导 24 h 时 RAW264.7 细胞中促炎细胞因子 *TNF-α* mRNA 表达以及 IL-1β 生成的抑制作用，还增强了 DHA 促进抗炎细胞因子 *IL*-10 mRNA 表达和蛋白生成。由此提示，硒能增强 DHA 在 LPS 诱导的炎症反应中的抗炎作用。

4 结 论

通过影响促炎细胞因子 *TNF*-α、*IL*-1β 及抗炎细胞因子 *IL*-10 mRNA 的表达，硒可增强 DHA 在 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抗炎作用。

参考文献:

[1] ALESSANDRI A L,SOUSA L P,LUCAS C D,et al.Resolution of inflammation:mechanisms and opportunity for drug development[J].Pharmacology & Therapeutics,2013,139(2):189–212.

[2] MARION-LETELLIER R,SAVOYE G,GHOSH S.Polyunsaturated fatty acids and inflammation[J].IUBMB Life,2015,67(9):659–667.

[3] HOFFMANN P R,BERRY M J.The influence of selenium on immune responses[J].Molecular Nutrition & Food Research,2008,52(11):1273–1280.

[4] 于昱,吕林,张亿一,等.硒对硒蛋白-谷胱甘肽过氧化物酶基因表达及其酶活性的调节[J].动物营养学报,2007,19(S1):469–474.

[5] ZARCZYŃSKA K,SOBIECH P,RADWINSKA J,et al.Effects of selenium on animal health[J].Journal of Elementology,2013,18(2):329–340.

[6] CHENG A W M,STABLER T V,BOLOGNESI M,et al.Selenomethionine inhibits IL-1β inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) and cyclooxygenase 2 (*COX*2) expression in primary human chondrocytes[J].Osteoarthritis and Cartilage,2011,19(1):118–125.

[7] BOOSALIS M G.The role of selenium in chronic disease[J].Nutrition in Clinical

Practice,2008,23(2):152–160.

[8] YANG D J,LIN J T,CHEN Y C,et al.Suppressive effect of carotenoid extract of *Dunaliella salina* alga on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells via NF-κB and JNK inactivationc[J].Journal of Functional Foods,2013,5(2):607–615.

[9] LIN W W,KARIN M.A cytokine-mediated link between innate immunity,inflammation,and cancer[J].Journal of Clinical Investigation,2007,117(5):1175–1183.

[10] RAHMAN M M,BHATTACHARYA A,FERNANDES G.Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid[J].Journal of Cellular Physiology,2008,214(1):201–209.

[11] WELDON S M,MULLEN A C,LOSCHER C E,et al.Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2007,18(4):250–258.

[12] MULLEN A,LOSCHER C E,ROCHE H M.Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2009,21(5):444–450.

[13] HONDA K L,LAMON-FAVA S,MATTHAN N R,et al.Docosahexaenoic acid differentially affects TNFα and IL-6 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids,2015,97:27–34.

[14] SOLANKI P,AMINOSHARIAE A,JIN G,et al.The effect of docosahexaenoic acid (DHA) on expression of *IL*-1*β*,*IL*-6,*IL*-8,and *TNF-α* in normal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages[J].Quintessence International,2013,44(6):393.

[15] VUNTA H,BELDA B J,ARNER R J,et al.Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages[J].Molecular Nutrition & Food Research,2008,52(11):1316–1323.

[16] MATTMILLER S A,CARLSON B A,CANDY J C,et al.Reduced macrophage selenoprotein expression alters oxidized lipid metabolite biosynthesis from arachidonic and linoleic acid[J].Journal of Nutritional Biochemistry,2014,25(6):647–654.

Selenium Enhances Anti-Inflammatory Effects of Docosahexaenoic Acid on Inflammatory Response in Macrophages Induced by Lipopolysaccharide

XU Qipin HUANG Yixin LUO Zhengzhong SHEN Liuhong YAO Xueping YU Shumin CAO Suizhong*

(*College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130*, China*)

Abstract: In order to investigate whether selenium (Se) affects anti-inflammatory action of docosahexaenoic acid (DHA) on lipopolysaccharide (LPS) induced-macrophage inflammatory response. RAW264.7 cells of mice macrophagic system were treated with 10 μg/mL DHA, 10 μg/mL DHA+0.05 μmol/L sodium selenite, 1 μg/ml LPS, 10 μg/mL DHA+1 μg/mL LPS, 10 μg/mL DHA+1 μg/mL LPS+0.05 μmol/L sodium selenite for 24 h, respectively, a normal group was set up without addition. The mRNA expression levels of tumor necrosis factor α (*TNF-α*), interleukin 1β (*IL-1β*), interleukin 6 （*IL*-6） and interleukin 10 (*IL*-10) in cells were measured by semi-quantitative reverse transcription PCR, and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to test contents of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 in supernatant of culture medium. The results showed that adding sodium selenite (0.05 μmol/L) not only significantly enhanced the inhibitory effects of DHA (10 μg/mL) on expression of proinflammatory cytokines *TNF-α* mRNA (P<0.05) and production of IL-1β (P<0.01), but also significantly enhanced the promoting effects of DHA (10 μg/mL) on mRNA expression of anti-inflammatory cytokine *IL*-10 in RAW264.7 cells induced by LPS (1 μg/mL) (P<0.01). Therefore, Se can enhance anti-inflammatory effects of DHA on inflammatory response in macrophages induced by LPS.

Key words: DHA; selenium; macrophages; anti-inflammatory effect

*Corresponding author, professor, E-mail: suizhongcao@ 126.com

（责任编辑　王智航）